

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Leona Pavlic

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

KOMPARACIJA RAZLIČITIH METODA IZDVAJANJA NEMATODA IZ TLA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Leona Pavlic

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

KOMPARACIJA RAZLIČITIH METODA IZDVAJANJA NEMATODA IZ TLA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Leona Pavlic

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

KOMPARACIJA RAZLIČITIH METODA IZDVAJANJA NEMATODA IZ TLA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Mirjana Brmež, mentor
3. Josipa Puškarić, mag.ing.agr., član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Morfologija nematoda	2
1.2. Trofičke grupe nematoda	3
1.3. Izdvajanje nematoda iz tla i biljnog materijala	4
2. PREGLED LITERATURE	8
3. MATERIJAL I METODE	10
3.1. Prikupljanje uzoraka	10
3.2. Metode izdvajanja	11
3.2.1. Metoda sita	11
3.2.2. Metoda lijevka	17
3.3. Prebrojavanje izdvojenih nematoda	19
4. REZULTATI	21
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČAK	25
7. LITERATURA	26
8. SAŽETAK	30
9. SUMMARY	31
10. POPIS SLIKA	32
11. POPIS GRAFIKONA	34

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Nematode su organizmi koji nanose štete biljkama, ali postoje i nematode koje štite biljke od drugih štetnih kukaca i imaju važnu ulogu u sustavu tla. Nematode su mikroskopski organizmi, nalik na crve, koji žive u vodenom filmu i porama vode u tlu. Najviše su rasprostranjene u gornjim slojevima tla gdje je obilje organske tvari, biljnog korijenja i drugih resurasa. Broj nematoda u tlu varira u rasponu 1-10 milijuna jedinki/m². (<http://blog.agrivi.com/hr>). Nematode predstavljaju najbrojniju skupinu višestaničnih organizama koja je prisutna u gotovo svim biotipovima (Sohlenius, 1980.). Najveći broj ih je prisutan u vodi. Prema Bongers i Ferris (1999.), četiri od pet višestaničnih organizama pripada nematodama. Naseljavaju tla, vodene biotipove - oceane, rijeke i jezera, polarne krajeve, a osim biljaka mogu parazitirati životinje i čovjeka. Budući da su toliko brojne i prisutne u svim tlima, vrlo se često koriste u ekološkim procjenama kvalitete tla. Pripadaju velikom broju trofičkih grupa, mogu se rangirati po velikom broju kriterija (c-p grupe, dužina života i sl.), lako se uzorkuju i identificiraju, mogu se uzorkovati u svim godišnjim dobima te se zbog toga može reći da reflektiraju stanje pojedinih ekosustava. Mogu indicirati onečišćenja, biljni pokrivač, klimatske promjene i sl. (Brmež, 2004.).

Postoje brojne metode obrade uzorka tla iz kojih se mogu izdvojiti nematode, sva od tih metoda ima svoje prednosti i nedostatke. Metode izdvajanja uzoraka iz tla su: metoda boca, metoda sita, metoda lijevka, Oostenbrinkov aparat te medora centrifuge. Metoda sita (Cobb, 1998.) sastoji se od niza koraka koji se moraju provesti kako bi pokus bio valjan. Metoda se bazira na preljevanju vode iz posuda kroz sita kako bi se izdvojio što veći broj nematoda te se nematode skupljaju u kolekcijsku posudu. Metoda lijevka (Baermann, 1917.) lako je provodljiv postupak i ne zahtjeva puno vremena. Koristi se lijevak koji se zatvara na kraju sa stezaljkom te se na vrh preko lijevka stavlja sito na koje se stavlja dvoslojna maramica. Metoda boca ili Erlenmeyer metoda (Seinhorst, 1956.) temelji se na sedimentaciji tla u četiri boce ispunjene vodom, pri čemu dolazi do odvajanja nematoda do čestica tla u vodenu suspenziju tijekom određenog vremena. Oostenbrinkova metoda (Oostenbrink, 1954.) koristi se za izdvajane nematoda iz tla, stelje, riječnog mulja ili drugih supstrata. Metoda se temelji na obliku, veličini i sedimentaciji između nematoda i čestica tla te na mobilnosti nematoda. Metoda centrifuge (Gooris, D' Herde, 1972.) koristi razlike u specifičnoj težini između nematoda i drugih čestica u uzorku. Ovakav način izdvajanja nematoda ubrzan je

centrifugom. Nakon centrifugiranja nematode plutaju u suspenziji, dok se većina drugih čestica taloži u talog. Suspenzija prolazi kroz sito, nakon čega se nematode prikupljaju i promatraju. Za provođenje pokusa potrebna je skupa oprema.

Cilj ovog rada je usporediti različite metode izdvajanja nematoda iz uzorka tla. Usporediti će se dvije metode, metoda sita (Cobb, 1918.) te metoda lijevka (Baermann, 1917.). Utvrditi će se koja je metoda učinkovitija te kojom metodom će se dobiti veći broj nematoda nakon 24h i 48h.

1.1. Morfologija nematoda

Nematode su mikroskopski sitni crvoliki organizmi koji nemaju pigment, ali mogu biti bijelkaste ili žućkaste ovisno o hrani koju konzumiraju. To su organizmi koji nemaju krvotok, ali posjeduju probavila, reproduktivni i živčani sustav. Nematode su pseudocelomatski beskolutičavci, bilateralno-simetričnog tijela (Slika 1.). Najveći broj ih je mikroskopskih duljina i to od 400 μm pa do 5 cm. Nematode manje od prosječnih veličina su najčešće biljnoparazitske nematode, dužine između 0,5 - 12 mm. Za razliku od nematoda tla, nematode u morima dosežu veličine do 8m (*Placentonema gigantisima*). Stijenku tijela čine kutikula, epiderma i uzdužna mišićna vlakna. Između stijenke tijela i unutrašnjih organa nalazi se pseudocel ispunjen tekućinom. Ženke nekih vrsta imaju cilindrično-nitasti oblik tijela (rod *Rhabditis*), dok ženke nekih vrsta mogu imati različite cistolike forme (rodovi: *Meloidogyne*, *Globodera* i *Heterodera*) (Ivezić 2008.). Na prednjoj strani glave nalaze se usta, na koja se nastavlja jednjak. Usni ustroj nematoda razlikuje se ovisno o načinu ishrane vrste. U usnoj šupljini fitoparazitnih nematoda nalazi se hitinirizirana bodlja ili stilet, koju zabadaju u biljne stanice i tako se hrane. Pomoću karakteristika stileta određuje se pripadnost redu nematoda (Oštrec, 1998.; Siddiqi, 2000.). Nematode su u pravilu razdvojena spola, a manji broj vrsta su hermafroditi. Češće su oviparne, no mogu biti i viviparne, dok je u pojedinim vrstama ustanovljena partenogeneza. S trbušne strane ženke nalazi se ženski spolni otvor (vulva), dok mušjaci imaju kopulatorni organ (par spikula) uz kloaku (Oštrec, 1998.; Siddiqi, 2000.). Stražnji dio tijela ili rep je dio tijela iza kloake. Rep može biti različite duljine i oblika, te je oblik repa važna odrednica prilikom determinacije vrste (Oštrec, 1998.).



Slika 1. Nematode (Izvor: www.goodhousekeeping.com)

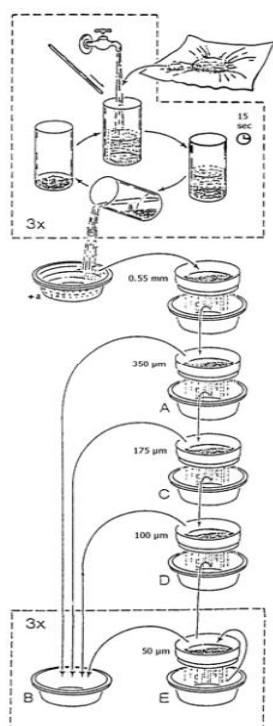
1.2. Trofičke grupe nematoda

Trofičke grupe nematoda predstavljaju njihovu podjelu prema načinu ishrane. Do danas je utvrđeno preko 15 različitih trofičkih grupa, no najčešće u našim tlima susrećemo pet trofičkih grupa. Susrećemo bakterivore, fitoparazitne nematode, fungivore, omnivore te predatore. Ovakav način klasifikacije naručito je koristan ekolozima kako bi razumjeli koje mjesto nematode zauzimaju unutar hranidbenog sustava. Bakterivore su nematode koje su brojne na mjestima s puno organske tvari isto tako one najbrže reagiraju na promjene u tlu te se mogu koristiti kao izvrsni indikatori zagađenja od teških metala. To su ujedno i nematode koje su korisne u razgradnji organske tvari. Fitoparazitne nematode su nematode koje imaju bodež kojim probijaju biljno tkivo i sišu sokove. Njih dijelimo na ektoparazite koji povremeno se ubušuju u biljno tkivo te na endoparazite koji provode cijelo vrijeme u biljnom tkivu te tu provode svoj životni vijek. Fungivore su nematode koje se hrane gljivama te se mogu hraniti parazitskim i saprofitskim gljivama u tlu. Koriste se kao izvrsni indikatori kiselosti tla. Omnivore su nematode koje se hrane širokim spektrom hrane te su ujedno i pokazatelji stabilnog ekosustava. Predatori su nematode koje se hrane drugim nematodama. Ukoliko ih ima u većem broju reflektiraju stabilan ekosustav (McSorley, 1997., Brmež, 2004., Ivezić, 2014.)

1.3. Izdvajanje nematoda iz tla i biljnog materijala

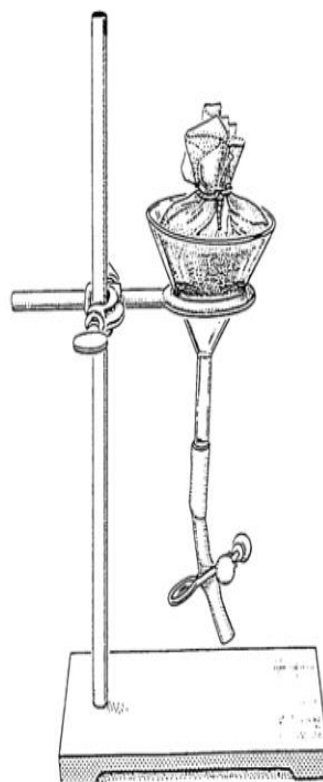
Nematode se mogu izdvajati iz tla i biljnog materijala. Prilikom uzorkovanja tla uzima se oko 1 kg tla. Tlo se može uzorkovati pomoću nematološke sonde ili štihače. Dobivene uzorke potrebno je staviti u plastične vrećice na koje bilježimo podatke o lokalitetu, površini, datumu, uzgajanoj kulturi te potpisu osobe koja je izvršila prikupljanje. Dubina uzorkovanja ovisi o uzgajanoj kulturi, ali najčešće je do 50 cm dubine. Prilikom uzimanja uzorka s biljnog materijala, potrebno ga je u količini od 100 g. Postoje različite metode izdvajanja nematoda, ovisno o njihovoj veličini, gustoći, pokretljivosti te vrsti materijala iz kojeg se izdvajaju. (<https://www.savjetodavna.hr/2008/01/16/kada-i-kako-ispravno-uzeti-uzorak-tla-za-analizu/>).

Najčešće korištene metode za izdvajanje nematoda iz tla su metoda sita, metoda lijevka, metoda boca, Oostenbrinkova metoda te metoda centrifuge. Metoda sita sastoji se od niza koraka tj. presipavanja suspenzije tla preko sita (Slika 2.). Metoda lijevka je metoda koja se koristi za izdvajanje aktivnih nematoda iz tla (Slika 3.).



Slika 2. Metoda sita

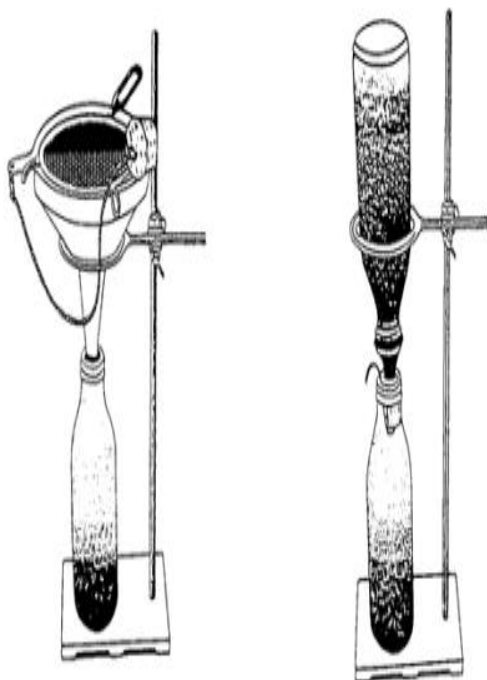
(Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)



Slika 3. Metoda lijevka

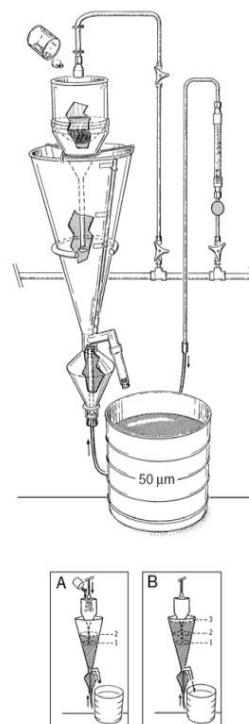
(Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)

Metoda boca ili Erlenmeyer metoda je metoda koja se koristi za izdvajanje aktivnih nematoda (Slika 4.). Metoda boca je metoda koja se temelji na razlici u veličini, sedimentaciji i obliku nematoda i čestica tla te pokretljivosti nematoda. Metoda zahtjeva puno rada i vremena, ali koristi jednostavnu opremu i malu količinu vode (Van Bezooijen J., 2006.).



Slika 4. Metoda boca

(Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)

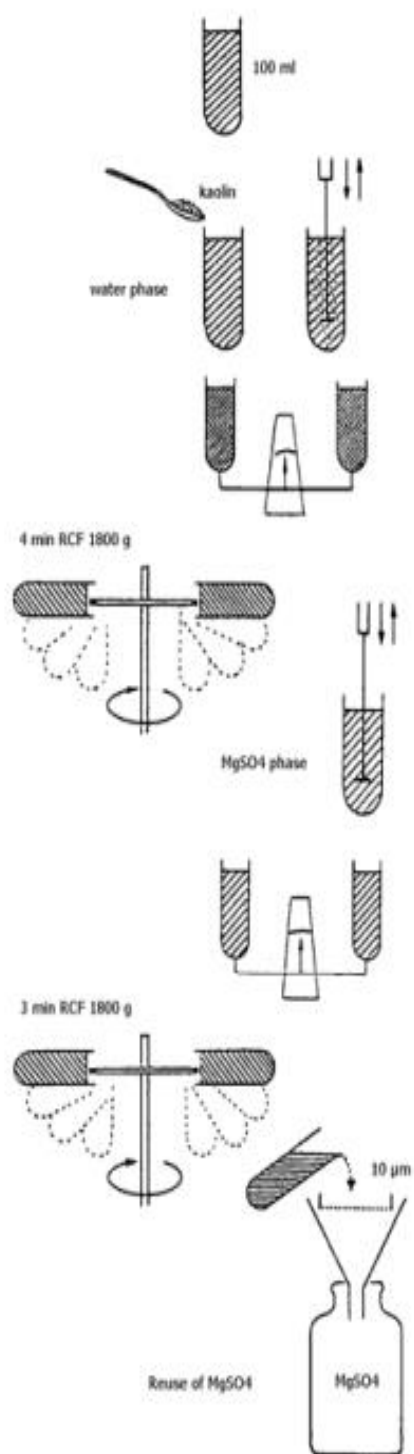


Slika 5. Oostenbrinkova metoda

(Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)

Oostenbrinkova metoda koristi se za izdvajanje nematoda iz tla, mulja, stelje i drugih sličnih supstrata (Slika 5.). Maksimalna veličina uzorka je 250 ml. Temelji se na veličini, obliku i sedimentaciji između nematoda i čestica tla (Van Bezooijen J., 2006.).

Metoda centrifuge se koristi za izdvajane aktivnih i neaktivnih nematoda iz tla, sedimenata te gnojiva (Slika 6.). Metoda omogućuje veliku obradu uzoraka. Metoda koristi razlike u specifičnoj težini između nematode i drugih čestica u uzorku. Ukoliko je uzorak s većom specifičnom težinom u odnosu na nematode, one će plutati. Metoda se sastoji od dva koraka, prvi korak je da se centrifugira vodena suspenzija nematode zajedno s tlom dok u drugom koraku, sediment se nalazi u tekućini za izdvajanje. Uzorak se vrlo brzo može izdvojiti te je čist, ali je potrebna skupa oprema (Van Bezooijen J., 2006.).



Slika 6. Centrifugalna metoda (Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)

Nematode iz biljnog tkiva, kao što su lukovice, lišće, stabljike ili korijenje moguće ih je izdvojiti na više načina, ovisno o vrstama i brojnosti nematoda te vrsti i količini uzorka. Najčešće korištene su disekcija, metoda lijevka, metoda inkubacije, kombinacija maceracije i sedimentacije i metoda kondenzacijskog lijevka. Disekcija je gdje biljni materijal gledamo pod mikroskopom i gleda se prisutnost nematoda te se može utvrditi prisutnost aktivnih i neaktivnih nematoda (Dayki, Hussey, 1985.). Metoda inkubacije (Young, 1954.) je učinkovita za izdvajanje aktivnih endoparazitskih nematoda. Kombinacija maceracije i sedimentacije (Southey, 1970.) se koristi za izdvajanje i aktivnih i neaktivnih endoparazitskih nematoda. Metoda kondenzacijskog koristi se za izdvajanje aktivnih nematoda iz biljnog materijala, čini je skup od 16 Baermannovih lijevaka.

2. PREGLED LITERATURE

Odabir metode izdvajanja nematoda iz tla ovisi o vrsti nematoda ili o vrsti biljnog materijala kao i o raspoloživim mogućnostima i opremljenosti laboratorija. Postoje različite metode izdvajanje nematoda iz uzoraka tla gdje svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke. Svakako nabolja metoda bi bila ona koja bi omogućila 100% učinkovitosti izdvojiti sve razvojne stadije nematoda bez obzira na tip tla i temperatura, ali s niskim utoškom rada, opreme i vode (McSorley, 1987.). Niti jedna postojeća metoda nije u skladu s navedenim i zbog toga je potrebno izabrati najprikladniju metodu za svaku situaciju.

Regmi i sur. (2014.) provodili su istraživanja u svrhu izdvajanja nematoda te daljnje determinacije na rodove. Korištene su metoda centrifugiranja i Cobbova metoda sita. Metoda centrifugiranja bila je bolja od Cobbove metode. Cobbovom metodom izdvojeno je 33 nematode dok je metodom centrifugiranja izdvojeno 85 nematoda.

Curran i Heng (1992.), usporedili su tri metode u cilju prebrojavanja entomopatogenih nematoda u uzorcima tla. Centrifugiranjem je izdvojen najveći broj nematoda, a manja odstupanja bila su kod provođenja Baermannove metode.

Metodom centrifugiranja, zaključuju Whitehead i Hemming (1965.) da je moguće izdvojiti 95% nematoda iz koncentrirane suspenzije mineralnih i organskih čestica tla. Slične rezultate dobivaju Heip i sur. (1974.), čiji je zaključak kako se više od 90% nematoda prisutnih u uzorku može izdvojiti nakon dva centrifugiranja

Mindermanovo israživanje (1962.) pokazuje kako je Baermannova metoda točnija i te da se tom metodom dobivaju pouzdaniji podaci nego li metodom centrifugiranja.

Baermanove metode korištena je za Ruessova i Funkeova istraživanja (1995.) gdje se rezultati uspoređuju s mikroskopskim pregledom. Ispituju i utjecaj vremena na izdvajanje nematoda. Zaključak je da je Baermannova metoda lijevka korisna tehnika za kvantitativna ispitivanja, ali ipak i da je manje pouzdana prilikom određivanja zajednica nematoda.

Izdvajanje rodova nematoda iz četiri tipa tla obavljeno je taloženjem, prosijavanjem, centrifugiranjem te pokretljivošću nematoda. Svim metodama je utvrđen sličan broj nematoda. Harrison i Green (1976.), nakon provedenog pokusa, zaključuju da je

centrifugiranje najučinkovitije za glinena tla, a Baermannova metoda najlošija za pjeskovita tla.

TsingHua (2004.) uspoređuje tri metode za izdvajanje nematoda, metodu centrifugiranja, Baermannovu metodu te metodu prebrojavanja u plitkoj posudi. Metodom centrifugiranja dobivaju se najbolji rezultati, slijedi ju Baermannova metoda, a metoda prebrojavanja u plitkoj posudi je najlošija.

Zec (2012.) uspoređuje učinkovitost triju metoda za izdvajanje nematoda. Korištene su metoda boca, metoda sita te metoda lijevka. Baermannovom metodom lijevka dobiveni su najčišći uzorci, a ujedno i najbolji rezultati, slijedi ju Seinhorstova metoda boca i kao najlošija se pokazala Cobbova metoda sita.

Temperatura za mobilnost nematoda može se razlikovati između vrsta nematoda. Najbolji primjer za to su sezonske promjene temperatura (McSorley,1987.). Barker i sur. (1969.), prikazuju kako je brojnost nematoda u uzorcima niža tijekom zime zbog neaktivnosti nematoda pri niskim temperaturama.

Minagawa (1979.), uspoređuje centrifugalnu metodu s Baermannovom metodom. Na temelju izoliranog broja nematoda iz uzoraka s polja na kojem se uzgajao krumpir. Zaključuje kako je veći broj nematoda izdvojen centrifugalnom metodom, a da je na Baermannovu metodu utjecalo nekoliko čimbenika kao što su temperatura, sezonsko razdoblje, razvojne faze, idr.

Saunders i All (1982.), uspoređuju Baermannovu metodu lijevka, centrifugalnu metodu i metodu sita. Zaključuju kako je Baermannova metoda najbolja za otkrivanje populacije nematoda *Entomophilic rhabditoides*.

Eksperimentalni rezultati Kerra i Vythilingama (1966.), pokazuje da je modificiranom Baermannovom metodom lijevka moguće u isto vrijeme izdvojiti nematode iz dva uzorka, a zaključuju da se pri povišenim temperaturama prilikom čuvanje smanjuje broj nematoda.

Flegg (1967.), Cobbovom metodom dolazi do zaključka da su vrijeme i temperatura značajni čimbenici prilikom izdvajanja rodova *Xiphinema* i *Longidorus* iz različitih tala.

3. MATERIJAL I METODE

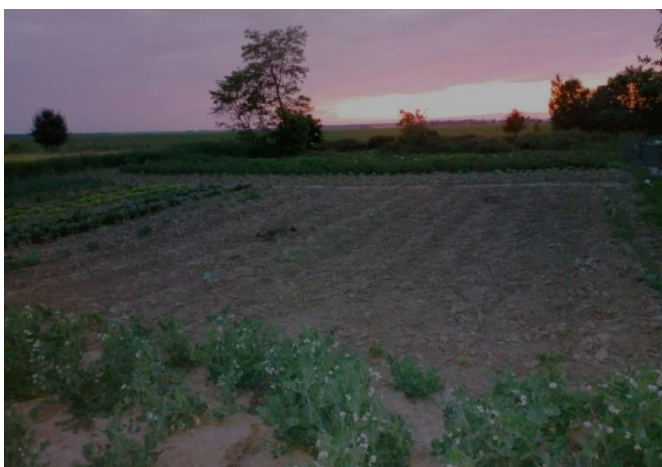
U cilju utvrđivanja učinkovitosti metoda izdvajanja nematoda iz tla postavljen je pokus na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek.

Izdvajanje nematoda iz tla prevedeno je u 4 tretmana:

1. Baermanova metoda ljevka, sedimentacija nematoda 24 sata (B 24)
2. Baermanova metoda ljevka, sedimentacija nematoda 48 sati (B 48)
3. Cobbova metoda sita, sedimentacija nematoda 24 sata (C 24)
4. Cobbova metoda sita, sedimentacija nematoda 48 sati (C 48)

3.1. Prikupljanje uzoraka

Prikupljanje uzoraka tla iz kojih su se izdvajale nematode izvršeno je na području Osječko baranjske županije u Petlovcu. Uzorak je uzet na privatnom vrtu gdje se sije povrće na 500 m² (Slika 7.). Uzorak je uzet 26.5.2019. godine. Uzorkovanje je učinjeno štihačom na način da se iskopala rupa te s 20 cm dubine je uzeto tlo (Slika 8.). Izvršeno je oko 10 do 15 uboda te se sve spojilo u jedinstven uzorak te parcele. Uzeto je oko 1,5 – 2 kg tla (Slika 9.). Nakon izvršenog uzorkovanja tlo se spremilo u plastičnu vrećicu s priloženom kraticom na kojoj je zapisan lokalitet, vrijeme, uzgajana kultura te površina polja (Slika 10.). Tlo se čuvalo u hladnjaku pri temperaturi od +4°C sve do izdvajanja nematoda pomoću dvije metode.



Slika 7. Vrt koji se ispituje (Foto: L. Pavlic)

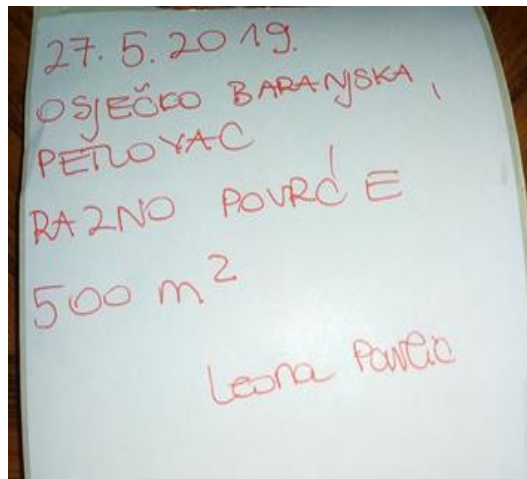


Slika 8. Dubina ukopavanja (Foto: L. Pavlic)



Slika 9. Uzeto tlo za uzorkovanje

(Foto: L. Pavlic)



Slika 10. Kratica s priloženim oznakama

(Foto: L. Pavlic)

3.2. Metode izdvajanja

Izdvajanje je izvršeno pomoću dvije metode, Cobbovom metodom sita (Cobb, 1918.) koja koristi gravitaciju za odvajanje nematoda i čestica tla kroz sito te Baermannovom metodom lijevka, koja se temelji na pokretljivosti nematoda i njihovoj tendenciji prelaska u čistu sredinu. Obje metode napravljene su u 4 ponavljanja, četiri uzorka ostavljena su 24 sata, a četiri uzorka 48 sati, kako bi nematode prošle u čistu vodenu otopinu. Nakon izdvajanja nematoda iz tla provedeno prebrojavanje uzoraka, kako bi se kasnije oni mogli statistički obraditi. Nakon provedenih analiza podaci su statistički obrađeni (analiza varijance) u programu SAS.

3.2.1. Metoda sita

Metoda sita se upotrebljava za izdvajanje aktivnih nematoda iz tla. Nematode se odvajaju od čestica tla nakon što se tlo pomiješa s vodom te se stvori suspenzija. Suspenzija se pretače kroz sita različitih veličina otvora te se ovom metodom izdvajaju različitih veličina nematode. Koriste se sita različitih veličina od 1000 μm , 365 μm , 180 μm , 105 μm i 45 μm . Pretakanjem nematode ostaju na situ, a nečistoće prolaze kroz sito. Materijal koji je potreban za provođenje pokusa je časa volumena 2 l, čaša od 100 ml, 2 posude nazvane posuda 1 i

posuda 2, set Cobbovih sita, posuda za prikupljanje nematoda nazvana koleksijska posuda. Nakon što se izvaže 100 g tla (Slika 11.), pomješa se s vodom, količine 1 l, u čaši volumena 2 l (Slika 12.).



Slika 11. Vaganje 100 g uzorka tla

(Foto: L. Pavlic)



Slika 12. Sipanje vode u dvolitrenu čašu

(Foto: L. Pavlic)

Štapićem se izmješa voda i tlo te ostavi 15-ak sekundi da se dobije homogena suspenzija. Suspenzija iz čaše od 2 l se sipa u posudu 1 (Slika 13.) te preostali talog ponovno izmješa sa 1 l vode, ostavi 15-ak sekundi da se voda smiri i ponovno sipa u posudu 1 (Slika 14.). Postupak se ponavlja tri puta.



Slika 13. Sipanje vode u posudu 1

(Foto: L. Pavlic)



Slika 14. Suspenzija u posudi 1

(Foto: L. Pavlic)

Nakon toga suspenzija iz posude 1 se kroz sito veličine od 1000 μm pretače u posudu 2 (Slika 15.). Nakon što se pretoči suspenzija u posudu 2 sito je potrebno blago protresti u suspenziji kako nematode nebi zaostale na njemu (Slika 16.). Ostaci sa sita od 1000 μm se zatim odbacuju.



Slika 15. Sipanje suspenzije iz posude 1 u posudu 2

(Foto: L. Pavlic)



Slika 16. Suspenzija u posudi 2

(Foto: L. Pavlic)

Suspenziju iz posude 2 nakon toga se pretoči kroz sito od 365 μm u posudu 1 (Slika 17.). Nematode i ostaci na situ se ne odbacuju nego se ispiru u kolekcijsku posudu (Slika 18.).



Slika 17. Pretakanje kroz sito od 365 μm

(Foto: L. Pavlic)



Slika 18. Ispiranje nematoda

(Foto: L. Pavlic)

Suspenzija iz posude 1 se kroz sito od 180 μ pretoči u posudu 2 (Slika 19.). Ostaci sa sita se ispiru u kolekcijsku posudu (Slika 20.).



Slika 19. Pretakanje suspenzije kroz sito od 180 μ m

(Foto: L. Pavlic)



Slika 20. Ispiranje nematoda

(Foto: L. Pavlic)

Suspenzija iz posude 2 se kroz sito od 105 μ m pretoči u posudu 1 (Slika 21.). Ostaci sa sita se ispiru u kolekcijsku posudu (Slika 22.).



Slika 21. Pretakanje kroz sito od 105 μ m

(Foto: L. Pavlic)



Slika 22. Ispiranje nematoda

(Foto: L. Pavlic)

Suspenzija iz posude 1 se kroz sito od 45 μm pretoči u posudu 2 (Slika 23.). Ostaci sa sita se ispiru u kolekcijsku posudu za prikupljanje nematoda (Slika 24.). Zadnji korak se ponavlja od 2 do 5 puta.



Slika 23. Pretakanje kroz sito od 45 μm

(Foto: L. Pavlic)



Slika 24. Ispiranje nematoda

(Foto: L. Pavlic)

Zatim se u plitku posudu postavlja sito na kojem je prethodno stavljena i namočena dvoslojna maramica ili nematološki filter papir. Maramicu na situ je potrebno navlažiti kako nebi ostalo previše zraka. U plitku posudu potrebno je sipati 100 ml vode (Slika 25.).



Slika 25. Pripremljena sita (Foto: L. Pavlic)

Ekstrakcijsko sito se polaže na križasti stalak. U sredinu sita se stavi satno staklo (Slika 26.). Preko satnog stakla se suspenzija iz koleksijske posude izljeva u ekstrakcijsko sito (Slika 27.). Nakon toga vadi se satno staklo i kada prođe sva voda kroz dvoslojnu maramicu ekstrakcijsko sito se diže i stavlja u ekstrakcijsku posudu.



Slika 26. Ekstrakcijsko sito sa satnim stalom

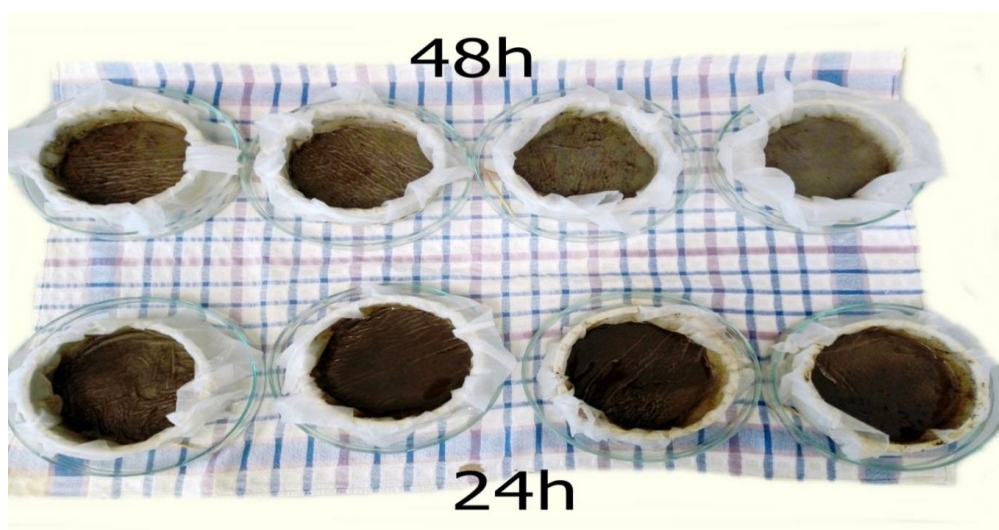
(Foto: L. Pavlic)



Slika 27. Sipanje suspenzije

(Foto: L. Pavlic)

Ovaj postupak traje 20-ak minuta. Budući da je potrebno 8 uzoraka gdje će se četiri uzorka pregledati nakon 24h, a preostala 4 nakon 48h. Suspenzije iz ekstrakcijskih posuda se nakon 24h i 48h izljevaju u čaše i uzorak je spreman za nematološku analizu (Slika 28.).



Slika 28. Pripremljeni uzorci za daljnu obradu (Foto: L. Pavlic)

3.2.2. Metoda lijevka

Za provedbu pokusa metodom lijevka potreban je slijedeći pribor: lijevak, stalaka za lijevak, gumene cijevi, stezaljke za gumenu cijev, sita, filter papir ili papirnate maramice i posude (Slika 29.).



Slika 29. Pribor za metodu lijevka (Foto: L. Pavlic)

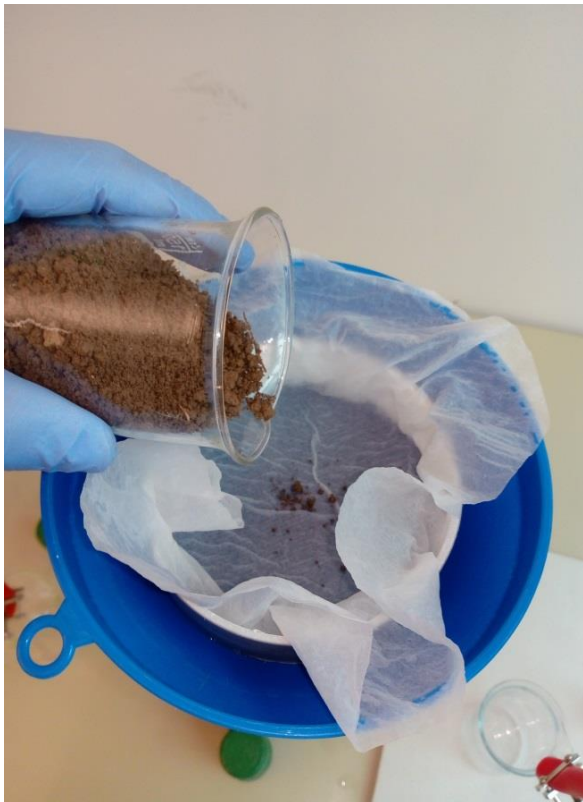
Postupak je jednostavan, lijevci se učvrste na stalku, preko sita se postavlja filter papir te se sita namjesti u lijevak (Slika 30.). Nakon prosijavanja zemlje te usnjavanja većih grudica tla (Slika 31.), izvaže se 100 g tla. Tada se na sito stavlja uzorak tla od 100 g (Slika 32.). Zatim se lijevak do samog ruba ispuni vodom (Slika 33.). Nakon određenog vremena nematode kroz sito prolaze u vodu lijevka. Pokus se ostavlja 24 sata te se voda izdvoji u posudu na način da se stezaljka otpusti, voda u posudama ostavlja se 2 sata te slijedi prebrojavanje nematoda. Na isti taj način nakon 48 sati voda se izdvaja. Nakon 24 i 48 sati prikuplja se od 5 do 10 ml suspenzije s nematodama za prebrojavanje.



Slika 30. Pripremljen pribor za pokus (Foto: L. Pavlic)



Slika 31. Prosijavanje tla (Foto: L. Pavlic)



Slika 32. Sipanje tla u sito (Foto: L. Pavlic)



Slika 33. Jedan od osam uzoraka (Foto: L. Pavlic)

3.3. Prebrojavanje izdvojenih nematoda

Nakon što je pokus uspješno priveden kraju, slijedi pregled ispranih uzoraka. Prebrojavanje izdvojenih nematoda najbolje je obaviti neposredno nakon izdvajanja nematoda. Ukoliko nije iz nekih razloga moguće obaviti prebrojavanje odmah, posude s vodom u kojoj se nalaze nematode moguće je staviti u hladnjak na $+4^{\circ}\text{C}$ do prebrojavanja, ali svakako je prebrojavanje najbolje napraviti odmah radi spriječavanja mogućeg razvoja gljivica ili bakterija u suspenziji koje mogu dovesti do smanjenja broj nematoda radi ugibanja. Za prebrojavanje nematoda potreban je mikroskop (Slika 34.). Za prebrojavanje koristi se iscrtana Petrijeva posuda ili Thoma-ova komora u kojoj se nalazi kvadratna mreža (Slika 35.). Prebrojavanje se vrši na način da se iz posude izdvoji suvišna voda, a nematode ostanu u maloj količini vode kako bi ih lakše prebrojali.



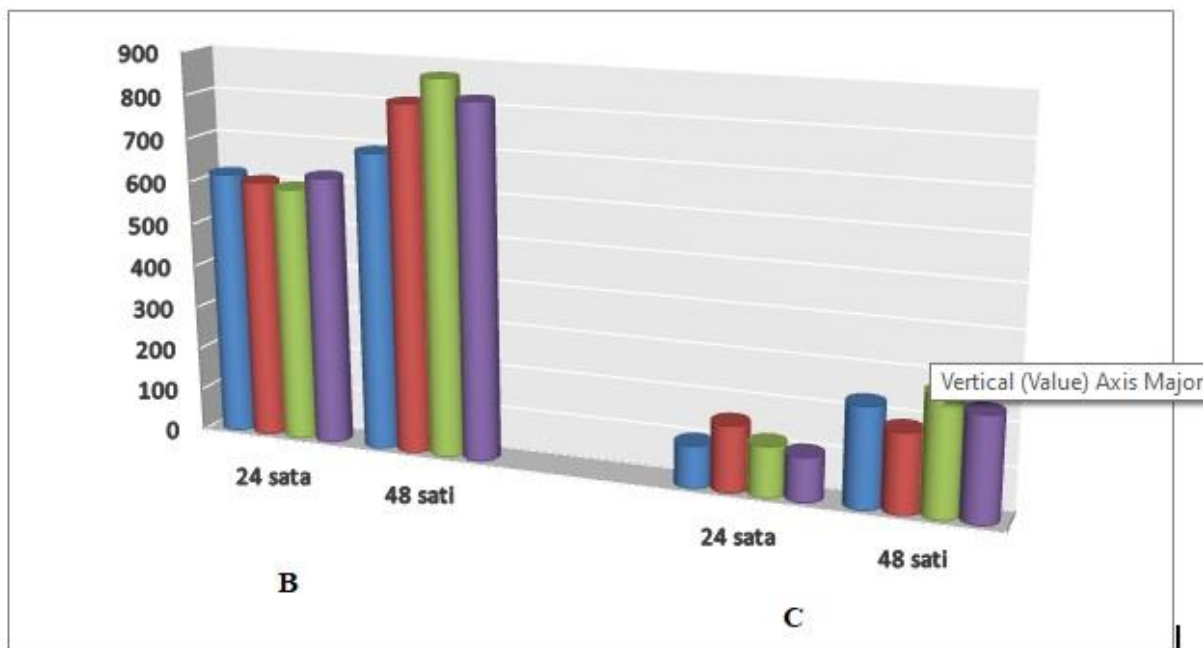
Slika 34. Mikroskop za prebrojavanje nematoda (Foto: L. Pavlic)



Slika 35. Nematode pod mikroskopom (Foto: L. Pavlic)

4. REZULTATI

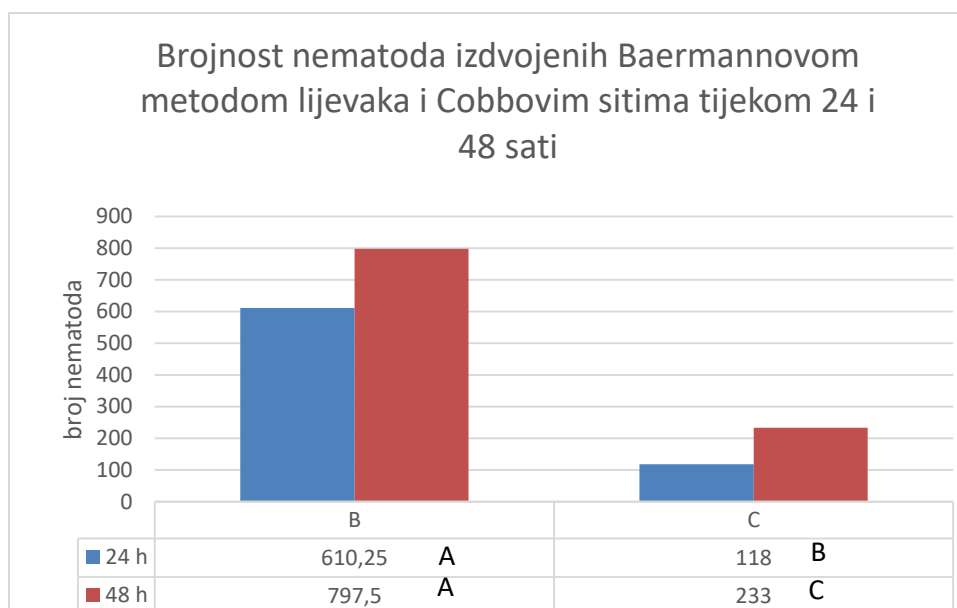
Uzorci tla analizirani su pomoću Baermannove metode lijevka i Cobbove metode sita. Izdvojene nematode prebrojavane su u četiri ponavljanja, tako da je ukupno pregledano šesnaest uzoraka tla. Rezultati provedenih analiza tj. brojnost izdvojenih nematoda pomoću dvije metode i dva vremena izdvajanja, prikazani su u Grafikonu 1.



Grafikon 1. Brojnost nematoda u uzorcima nakon 24 i 48 sati

Statistički veći broj nematoda izdvojen je Baermanovom metodom lijevka u odnosu na Cobbovu metodu sita.

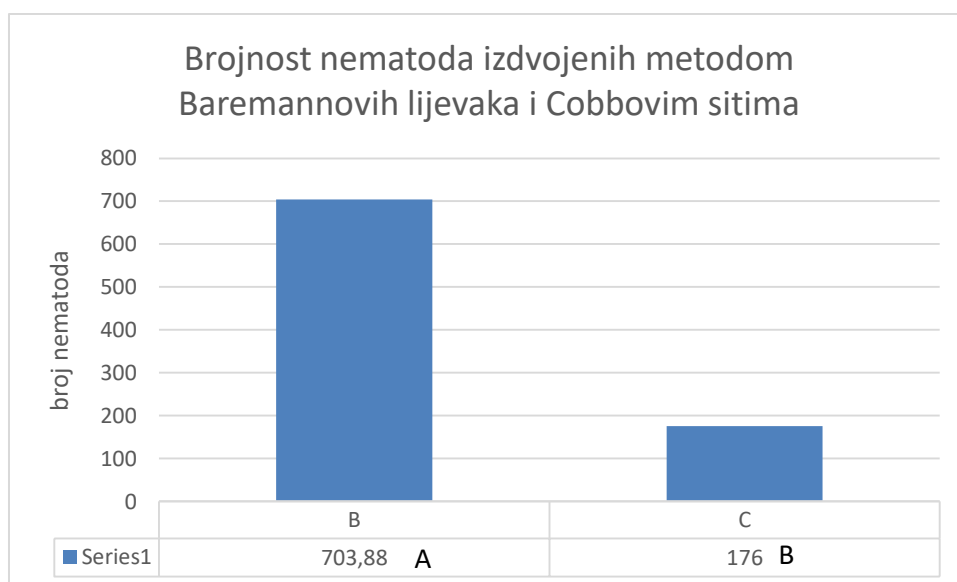
Brojnost nematoda se nije značajno povećala nakon dodatnih 24 sati niti u jednoj metodi (Grafikon 1.). Uzorci dobiveni metodom sita (C) bili su puni nečistoća, te ih je bilo teže prebrojavati. Statistički značajne razlike nisu utvrđene između 24 i 48 sati sedimentacije nematoda, iako je broj nematoda nakon 48 sati porastao u obje korištene metode izdvajanja nematoda iz tla.



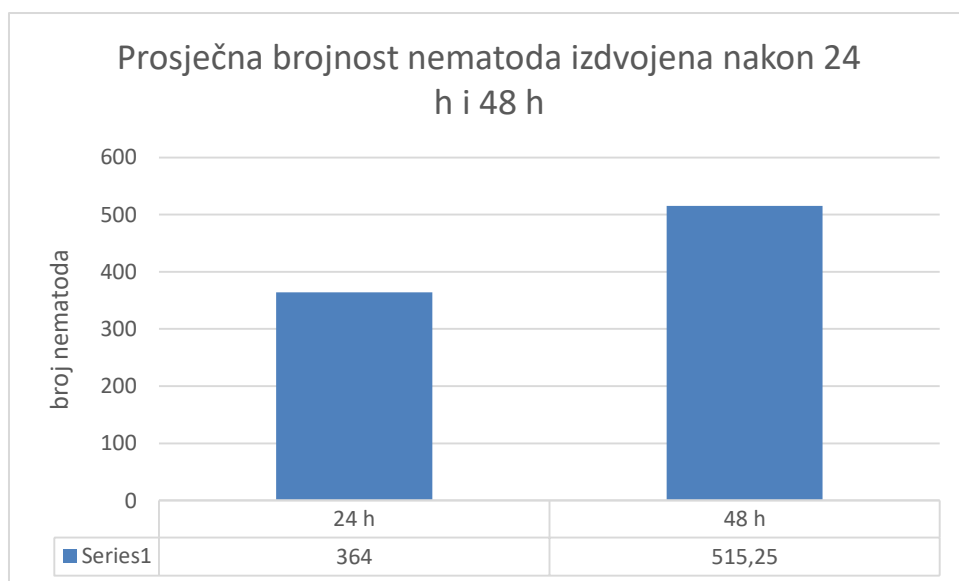
Vrijednosti označene različitim slovima (u redovima i stupcima) odnose se na statistički značajne razlike ($P < 0,01$)

Grafikon 2. Brojnost nematoda izdvojenih B i C metodom, tijekom 24 i 48 sati

Statističkom obradom podataka utvrđene su značajne razlike između Baermannove metode lijevaka i Cobbove metode sita, dok nije bilo statistički značajnih razlika u podtretmanima tj. izdvojeni broj nematoda nakon 24 sata nije se statistički značajno razlikovao od broja nematoda izdvojenih nakon 48 sati sedimentacije.



Grafikon 3. Prosječna brojnost nematoda izdvojenih metodom Baermannovih lijevaka i Cobbovim sitima



Grafikon 4. Prosječna brojnost nematoda izdvojenih tijekom 24 i 48 sati

5. RASPRAVA

Kako bi izdvajanje nematoda iz tla bilo što učinkovitije, veliki broj znanstvenika proučavao je učinkovitost pojedinih metoda izdvajanja nematoda iz tla i biljnog materijala. U ovom diplomskom radu Baermanova metoda lijevka i Cobbova metoda sita korištene su za izdvajanje nematoda iz tla, upravo zato što su najčešće korištene i u svijetu i kod nas. Baermannova metoda pokazala se znatno boljom metodom. Statistički je značajno veći broj nematoda izdvojen metodom lijevaka nego metodom sita. Slične rezultate dobili su brojni znanstvenici te su ovdje navedeni samo neki znanstveni radovi koji potvrđuju navedenu tezu i potkrepljuju naše rezultate.

Kao najbolju metodu za ispitivanje brojnosti nematoda, gdje su korištene tri metode, Seinhorstova metoda boca, Cobbova metoda sita te Baermanova metoda lijevka. Baermanova metoda sita se pokazala najboljom navodi Zec (2012.). Njome su također dobiveni najčišći uzorci, tj. nakon izdvajanja nematoda iz tla nisu se izdvojile i nečistoće koje bi onemogućile prebrojavanje uzoraka. Također je utvrdila, slično našim istraživanjima, kako su Cobbovom metodom sita dobiveni prljaviji uzorci. Druga po brojnosti izdvojenih metoda pokazala se metoda boca, tj. Seinhorstova metoda, a najlošija je bila metoda sita. U njenim istraživanjima brojnost nematoda koje su izdvojene pojedinim metodama bila vrlo slična (sita – 714, boce 895 i lijevci 935), dok je u našem ispitivanju utvrđena puno veća razlika između prosječne brojnosti metode lijevka (703) i metode sita (176).

Komparirajući ove dvije metode, Saundersa i Alla (1982.) također su dobili slične rezultate tj. ustanovili su kako je Baermanova metoda znatno bolja od Cobbove metode sita.

Baermanova metoda lijevka se pokazala kao bolja metoda za kvantitativna istraživanja i nakon 24 sata, ali i nakon 48 sati iako postoje podaci točnije pretpostavke koje navode Kiritani i Matsuzaki (1969.), Ustanovili su i da se brojnost nematoda smanjuje nakon dužeg vremena provedenog u vodi zato što one postanu neaktivne.

Osim navedenih referenci, postoji još veliki broj radova koji potkrepljuju gore navedene tvrdnje, a osim što je Baermannova metoda vrlo učinkovita, ne iziskuje posebno skupu aparaturu, jeftina je za nabaviti, brza, te korištena u gotovo svim nematološkim laboratorijima diljem svijeta.

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je usporediti brojnost nematoda izdvojenih iz 100 g tla i to Baermannovom metodom lijevka te Cobbovom metodom sita. Nakon prebrojavanja izdvojenih nematoda, podatci su statistički obrađeni. Utvrđene su statistički značajne razlike u brojnosti nematoda izdvojenih pojedinim metodama izdvajanja i to statistički značajno više nematoda izdvojeno je metodom lijevka (704) nego metodom sita (176). Baermannova metoda lijevka pokazala se znatno boljom, jednostavnijom i bržom. Statistički značajne razlike nisu uočene između vremena prelaska nematoda kroz sita od 24 i 48 sati. Postoje velike razlike između metoda u smislu troškova (oprema, rad, voda). Metode koje se temelje na pokretljivosti nematoda pokazale su se kao jednostavnije i jeftinije te se one najčešće koriste.

7. LITERATURA

1. Baermann, G. (1917.): Eine eifache Methode Zur Auffindung von Anklyostomum (Nematoden) larven in Erdproben. Geneesk. Tijdschr. Ned. – Indie 57: 131 – 137.
2. Baunacke, W. (1922.): Untersuchungen zum Biologie und Bekämpfung der Rubennematoden, *Heterodera schachtii* Schmidt. Arb. Biol. Reichsanst. Berlin 11: 185 – 288.
3. Bongers, T., Ferris, H. (1999.): Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. Trends in Ecology & Evolution, 14 (6): 224 – 228.
4. Brmež, M. (2004.): Nematode kao bioindikatori promjena u agroekosustavu. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Osijek.
5. Brmež, M., Ivezić, M., Raspudić, E., Tripar, V., Baličević, R. (2007.): Nematode communities as bioindicators of antropogenic influence in agroecosystems. Cereal Research Communications (35) 2: 297 - 300.
6. Brmež, M., Varga, I., Benković-Lačić, T., Lončarić, Z. (2014.): Utjecaj fosfora i cinka na zajednicu nematoda pri uzgoju feferona (*Capsicum Annuum* L.) Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Osijek.
7. Cobb, N. A. (1918.): Estimating the nematode population of the soil. Agric. Tech. Circ. Bur. Pl. Ind. U.S. Dep. Agric., No.1: 48 pp.
8. Daykin, M. E., Hussey, R. S. (1985.): Chapter on Staining and Histopathological Techniques in Nematology 39 – 46. In Advance Treatise on Meloidogine. Vol. II – Methodology (K. R. Barker, C. C. Carter and J.N. Sasser, eds.). North Carolina State University Graphics: 213 pp.
9. Fenwick, D. W. (1940.): Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera*
10. Ferris, H. (2003.): Nematodes: Ecology, University of California, Dacvis, pp. 809 – 812.
11. Flegg, J. J. M. (1967.): Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification od Cobb's decenting and sieving technique. Ann. Appl. Biol., 60: 429 – 437.
12. Gooris, J., D'Herde, C. J. (1972.): A method for the quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. from soil. Stat. Nematol. Entomol. Res. Stat. Ghent, 35 p.

13. Harrison, J. M., Green, C. D. (1976.): Comparison of centrifugal and other methods for standardization of extraction of nematodes from soil. *Annals of Applied Biology* Volume 82, Issue 2, pp. 299–308.
14. Heip, C., Smol, N., Hauntekiet, W. (1974.): A rapid method of extracting meiobenthic nematodes and copepods from mud and detritus. *Marine Biology* Volume 28, Number 1: 79 – 81.
15. Ivezić, M. (2014.): *Fitonematologija*. Poljoprivredni fakultet Osijek. pp. 109.
16. Ivezić, M., Raspudić, E., Brmež, M. (2000.): Structure of nematode communities in different agroecosystems in Croatia. *Helminthologia*, 37(3):165-169.
17. Kerr, A., Vythilingam, M. K. (1966.): Factors Influencing the Extraction of Nematodes From Soil. *Nematologica*, Volume 12, Number 4: 511 – 517.
18. Kiritani, K., Matuzaki, T. (1969.): On the extraction rate of nematodes by the Baermann Funnel. *Bull. Kochi. Inst. Agric. For. Sci.* 2: 25 – 30.
19. McSorley, R. (1997.): *Soil Inhabiting Nematodes, Phylum Nematoda*. University of Florida. Institute of Food and Agriculture Sciences. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN13800.pdf>
20. McSorley, R. (2003.): Adaptions of Nematodes to Environmental Extrems. *Florida Entomologist* 86 (2): 138-142.
21. Minagawa, N. (1979.): Efficiencies of Two Method for Extracting Nematodes from Soil. *Applied entomology and zoology*, 14 (4): 469 – 477.
22. Minderman, G. (1962.): Nematode extraction methods for forest soil. In Murphy, P. W. (ed.), *Progress in Soil Zoology*, 257 – 60.
23. Oostenbrink, M. (1954.): Een doelmatige methode voor het toetsen van aaltjesbestrijdingsmiddelen in grond met *Hoplolaimus uniformis* als proefdier. *Meded. LandbHogesch. Gent* 19: 377-408.
24. Oštrec, Lj. (1998.): *Zoologija: štetne i korisne životinje u poljoprivredi*. Zrinski d.d. Čakovec, 232 str.
25. Oštrec, Lj. (2001.): Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Pest Insects, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Volume 66: 129 – 132.
26. Regmi, H., Kumar Ngangbam, A., Devi Nongmaithem, B. (2014.): Extraction techniques of Plant-parasitic nematodes and cysts: a practical comparison. *Agricultural research communication centre. Agric. Sci. Digest.*, 34 (4) : 273 – 276.
27. Ruess, L., Funke, W. (1995.): Nematode fauna of a spruce stand associated with forest decline. *Acta Zool. Fenn.* 196: 348 – 51.

28. Sauders, M. C., All, J. N. (1982.): Laboratory extraction methods and field detection of entomophilic rhabditoid nematodes for soil Environ. Entomol., 11: 1164 – 1165.
29. Seinhorst, J. W. (1956.): The quantitative extraction of nematodes from soil. Nematologica 1: 249-267.
30. Siddiqi, M.R. (1997.): Techniques and methodologies for nematode disease diagnosis and nematode identification, FAO Corporate document, pp. 144.
31. Siddiqi, M.R. (2000.): Tylenchida: Parasites of Plants and Insects. 2nd Edition. CABI Publishing: pp. 848.
32. Southey, J. (1970.): Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Tech. Bull. 2. Her Majesty's Stationary Office: 148 pp.
33. TsingHau (2004.): Extraction efficiency of soil nematodes by different methods. Chinese Journal of Ecology.
(<http://www.shvoong.com/business-management/1606195-extraction-efficiency-soil-nematodes-different/>) 18.6.2019.
34. Van Bezooijen J. (2006.): Methods And Techniques For Nematology Revised version, 118 str. (pdf)
35. Whitehead, A. G, Hemming, J.R. (1965.): A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Ann Appl Biol 55: 25 – 38.
36. Yeates, G.W., Bongers, T.R., De Goede, G.M., Freckman, D.W., and Georgieva, S.S. (1993.): Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera — An Outline for Soil Ecologists. Journal of Nematology 25(3): 315–331.
37. Yeates, W.G. (2010.): Nematodes in ecological Webs, Wiley Online Library, pp. 1 - 8.
38. Young, T. W., (1954.): An Incubation Method for Collecting Migratory Endoparasitic Nematodes. Pl. Dis. Rptr., 38: 794-795.
39. Zec, M. (2012.): Usporedba učinkovitosti različitih metoda izdvajanja nematoda iz tla. Diplomski rad. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Osijek.
40. Zec, M., Brmež, M., Ivezić, M., Raspudić, E., Majić, I. (2012.): Usporedba učinkovitosti različitih metoda izdvajanja nematoda iz tla. Glasnik zaštite bilja 5; 6-16.
41. <https://www.agroplus.hr/>
42. <https://www.ecologycenter.us/microbiology/nematode-extraction-techniques.html>
43. <http://www.proeco.hr/entomopatogene-nematode-saveznici-suzbijanju-zemljisnih-stetnika/>
44. <https://www.goodhousekeeping.com/home/gardening/a20705657/nematodes/>

45. <https://nematode.unl.edu/wormgen.htm>
46. http://pinova.hr/hr_HR/aktualno/entomopatogene-nematode-entomoinsekticidi-u-suzbijanju-stetnih-insekata
47. <https://www.savjetodavna.hr/2008/01/16/kada-i-kako-ispravno-uzeti-uzorak-tla-za-analizu/>
48. <http://blog.agrivi.com/hr>

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je usporediti različite metode izdvajanja nematoda iz uzorka tla s obzirom na njihovu populaciju i dinamiku izdvajanja te dobivene podatke statistički obraditi. Izdvajanje nematoda iz tla izvršeno u dva tretmana - Baermanovom metodom lijevka i Cobbovom metodom sita na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, u zavodu za fitomedicinu. I jednom i drugom metodom, nematode su se izdvajale u dva podtretmana i to 24 h i 48 h. Ukupno su nematode izdvojene iz 16 uzoraka tla, te prebrojane i analizirane. Baermannovom metodom lijevka izdvojeno je statistički značajno više nematoda (703) u odnosu na Cobbovu metodu sita (176), dok se brojnost izdvojenih nematoda nije razlikovala nakon 24 h i 48 h sedimentacije nematoda, tj. prelaska nematoda u čistu sredinu. Baermanovom metodom lijevaka dobili smo znatno čistije uzorke izdvojenih nematoda koje je kasnije bilo vrlo lagano prebrojavati za razliku od nematoda koje su izdvojene metodom sita, čiji uzorci su bili prljavi i vrlo teški za prebrojavanje. Također je sama provedba pokusa jednostavnija i puno brža metodom lijevaka nego li Cobbovom metodom sita.

Ključne riječi: izdvajanje nematoda iz tla, metoda lijevka, metoda sita, brojnost nematoda

9. SUMMARY

The aim of the study was to compare different methods of nematode extraction from soil and the obtained data are statistically processed. Two treatments were performed: Baermann funnel method and Cobb sieving method. Extraction of nematodes from soil was carried out at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, in Department for Phytomedicine. Experiment was conducted in two sub treatments, nematodes were extracted from soil 24 h and 48 h. A total of 16 samples were examined. Baermann's funnel method obtained statistically higher extracted nematode population (703) in compare to Cobb sieving method (176). Also Baermann funnel technique had cleaner samples, which was easily to calculated in compare to dirty samples obtained by Cobb method. Baermann funnel methods showed to be more simple, cheap and efficacy method for nematode extraction from the soil.

Key words: nematode extraction from the soil, funnel method, sieve method, number of nematodes

10. POPIS SLIKA

Broj	Naziv slika	Stranica
	Slika 1. Nematode (Izvor: www.goodhousekeeping.com)	3
	Slika 2. Metoda sita (Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)	4
	Slika 3. Metoda lijevka (Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)	4
	Slika 4. Metoda boca (Van Bezooijen J., 2006.)	5
	Slika 5. Oostenbrinkova metoda (Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)	5
	Slika 6. Centrifugalna metoda (Izvor: Van Bezooijen J., 2006.)	6
	Slika 7. Vrt koji se ispituje (Foto: L. Pavlic)	10
	Slika 8. Dubina ukopavanja (Foto: L. Pavlic)	10
	Slika 9. Uzeto tlo za uzorkovanje (Foto: L. Pavlic)	11
	Slika 10. Kratica s priloženim oznakama (Foto: L. Pavlic)	11
	Slika 11. Vaganje 100 g uzorka tla (Foto: L. Pavlic)	12
	Slika 12. Sipanje uvode u dvolitrenu čašu (Foto: L. Pavlic)	12
	Slika 13. Sipanje vode u posudu 1 (Foto: L. Pavlic)	12
	Slika 14. Suspenzija u posudi 1 (Foto: L. Pavlic)	12
	Slika 15. Sipavanje suspenzije iz posude 1 u posudu 2 (Foto: L. Pavlic)	13
	Slika 16. Suspenzija u posudi 2 (Foto: L. Pavlic)	13
	Slika 17. Pretakanje kroz sito od 365 µm (Foto: L.Pavlic)	13
	Slika 18. Ispiranje nematoda (Foto: L. Pavlic)	13
	Slika 19. Pretakanje suspenzije kroz sito od 180µm (Foto: L. Pavlic)	14
	Slika 20.Ispiranje nematoda (Foto: L. Pavlic)	14
	Slika 21. Pretakanje kroz sito od 105 µm (Foto: L.Pavlic)	14
	Slika 22. Ispiranje nematoda (Foto: L. Pavlic)	14
	Slika 23. Pretakanje kroz sito od 45 µm (Foto: L. Pavlic)	15
	Slika 24. Ispiranje nematoda (Foto: L. Pavlic)	15
	Slika 25. Pripremljena sita (Foto: L. Pavlic)	15
	Slika 26. Ekstrakcijsko sit sa satnim stalom (Foto: L. Pavlic)	15
	Slika 27. Sipavanje suspenzije (Foto: L. Pavlic)	15
	Slika 28. Pripremljeni uzorci za daljnu obradu (Foto: L. Pavlic)	16
	Slika 29. Pribor za metodu lijevka (Foto: L. Pavlic)	17
	Slika 30. Pripremljena pribor za pokus (Foto: L.Pavlic)	18
		32

Slika 31. Prosijavanje tla (Foto: L. Pavlic)	18
Slika 32. Sipanje tla u sito (Foto: L. Pavlic)	18
Slika 33. Jedan od osam uzoraka (Foto: L. Pavlic)	18
Slika 34. Mikroskop za prebrojavanje nematoda (Foto: L. Pavlic)	19
Slika 35. Nematode pod mikroskopom (Foto: L. Pavlic)	20

11. POPIS GRAFIKONA

Broj	Naziv grafikona	Stranica
	Grafikon 1. Brojnost nematoda u uzorcima nakon 24 i 48 sati	21
	Grafikon 2. Brojnost nematoda izdvojenih B i C tijekom 24 i 48 sati	22
	Grafikon 3. Prosječna brojnost nematoda izdvojenih metodom Baermannovih lijevaka i Cobbvim sitima	22
	Grafikon 4. Prosječna brojnost nematoda izdvojenih tijekom 24 i 48 sati	23

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Diplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Zaštita bilja

KOMPARACIJA RAZLIČITIH METODA IZDVAJANJA NEMATODA IZ TLA

Leona Pavlic

Sažetak: Cilj istraživanja bio je usporediti različite metode izdvajanja nematoda iz uzorka tla s obzirom na njihovu populaciju i dinamiku izdvajanja te dobivene podatke statistički obraditi. Izdvajanje nematoda iz tla izvršeno u dva tretmana - Baermanovom metodom lijevka i Cobbovom metodom sita na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, u zavodu za fitomedicinu. I jednom i drugom metodom, nematode su se izdvajale u dva podtretmana i to 24 h i 48 h. Ukupno su nematode izdvojene iz 16 uzoraka tla, te prebrojane i analizirane. Baermanovom metodom lijevka izdvojeno je statistički značajno više nematoda (703) u odnosu na Cobbovu metodu sita (176), dok se brojnost izdvojenih nematoda nije razlikovala nakon 24 h i 48 h sedimentacije nematoda, tj. prelaska nematoda u čistu sredinu. Baermanovom metodom lijevka dobili smo znatno čistije uzorke izdvojenih nematoda koje je kasnije bilo vrlo lagano prebrojavati za razliku od nematoda koje su izdvojene metodom sita, čiji uzorci su bili prljavi i vrlo teški za prebrojavanje. Također je sama provedba pokusa jednostavnija i puno brža metodom lijevka nego li Cobbovom metodom sita.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Brmež

Broj stranica: 34

Broj grafikona i slika: 39

Broj literaturnih navoda: 48

Broj priloga:

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: izdvajanje nematoda iz tla, metoda lijevka, metoda sita, brojnost nematoda

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Mirjan Brmež, mentor
3. Josipa Puškarić, mag.ing.agr., član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Graduate thesis****Graduate thesis Faculty of agrobiotechnical science Osijek****University Graduate Studies, Plant production, course Plant Protection****COMPARATION OF DIFFERENT METHODS OF NEMATODE EXTRACTION FROM SOLI**

Leona Pavlic

Abstract: The aim of the study was to compare different methods of nematode extraction from soil and the obtained data are statistically processed. Two treatments were performed: Baermann funnel method and Cobb sieving method. Extraction of nematodes from soil was carried out at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, in Department for Phytomedicine. Experiment was conducted in two sub treatments, nematodes were extracted from soil 24 h and 48 h. A total of 16 samples were examined. Baermann's funnel method obtained statistically higher extracted nematode population (703) in compare to Cobb sieving method (176). Also Baermann funnel technique had cleaner samples, which was easily to calculated in compare to dirty samples obtained by Cobb method. Baermann funnel methods showed to be more simple, cheap and efficacy method for nematode extraction from the soil.

Thesis performed at: Faculty of agrobiotechnical science Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Mirjana Brmež

Number of pages: 34

Number of figures: 39

Number of references: 48

Original in: Croatian

Key words: nematode extraction from the soil, funnel method, sieve method, number of nematodes

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. prof.dr.sc. Emilija Raspudić, chair member
2. prof.dr.sc. Mirjana Brmež, mentor
3. Josipa Puškarić, mag.ing.agr., member

Thesis deposited at: Library, Faculty of agrobiotechnical science Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of

Osijek, Vladimira Preloga 1